

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-33115

(43) 公開日 平成10年(1998) 2月10日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 C	9/123		A 2 3 C	9/123
	21/00			21/00
	21/02			21/02
A 2 3 L	2/38		A 2 3 L	2/38 P
C 1 2 N	9/99		C 1 2 N	9/99
審査請求 有 請求項の数 4 F D (全 11 頁)				

(21) 出願番号 特願平8-212114

(22) 出願日 平成8年(1996) 7月24日

(71) 出願人 597059753

農畜産業振興事業団

東京都港区麻布台2丁目2番1号

(71) 出願人 596118149

社団法人全国農協乳業プラント協会

東京都千代田区大手町1-8-3

(72) 発明者 伊藤 敏敏

宮城県仙台市泉区将監2丁目20-7

(72) 発明者 ▲斎▼藤 忠夫

宮城県仙台市青葉区国見6丁目9-8

(74) 代理人 弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

(54) 【発明の名称】 ホエー飲料とその製造法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、ホエーをベースにした保健栄養効果の高い新型ドリンクを提供しようとするものであり、乳成分濃度と乳酸菌数を制御することで、発酵乳としても乳酸菌飲料とすることもできる。本発明は、高いACE転換阻害活性を有するため、血圧降下作用が期待できるホエー飲料を提供することを目的とし、さらに、有用乳酸菌やその発酵代謝物を共に含有しているため、免疫賦活化能が期待でき、風味も良好なホエー飲料を提供することを目的とする。

【解決手段】 ホエー由来の新規生理活性ペプチド類、乳酸菌及びその代謝生産物を含有するホエー飲料、並びにホエーにタンパク質分解酵素を作用させ、新規生理活性ペプチド類を遊離させたホエー加水分解物を得た後、乳酸菌を接種し、乳酸発酵させることを特徴とする前記ホエー飲料の製造法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ホエー由来の新規生理活性ペプチド類、乳酸菌及びその代謝産物を含有するホエー飲料。

【請求項2】 新規生理活性ペプチド類がアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するものである請求項1記載のホエー飲料。

【請求項3】 ホエーにタンパク質分解酵素を作用させ、新規生理活性ペプチド類を遊離させたホエー加水分解物を得た後、乳酸菌を接種し、乳酸発酵させることを特徴とする請求項1記載のホエー飲料の製造法。

【請求項4】 新規生理活性ペプチド類がアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するものである請求項3記載の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ホエー飲料とその製造法に関し、詳しくは、ホエー由来の新規生理活性ペプチド類、乳酸菌及びその代謝産物を含有するホエー飲料とその製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】ホエー（チーズホエー）は、乳糖を主成分とし、その他タンパク質およびミネラル分を含む溶液である。このホエーは、チーズやカゼイン等を製造する際、副産物として大量に生成するが、従来は大部分がそのまま廃棄されていた。このため、深刻な環境汚染（水質汚染）の原因となり、世界的に深刻な問題となっていた。

【0003】現在、我が国では、ホエーは主に噴霧乾燥されてホエーパウダーを製造したり、或いは成分を膜処理技術（逆浸透、限外濾過、イオン交換など）により分画して、乳糖、ホエータンパク濃縮物（WPC）等の製造に用いられている。これらの製品は、家畜飼料や食品工業における各種原料に用いられているが、その利用の程度は、単に乳製品（乳飲料、ヨーグルト、発酵乳など）の製造時に固形分を増やすために添加される、いわゆる増量剤としての利用に止まっており、とても高度な利用が図られているものとは言い難いのが現状である。

【0004】しかも、噴霧乾燥や膜処理技術による成分分画などには、巨額の設備投資とランニングコストがかかっており、製造コストに比べて、実際の製品の価格が安価なため、世界的にはそれほど利用されておらず、より付加価値の高い利用法が求められている。従って、世界的に見ると、相変わらず、ホエーの大部分を廃棄しているのが実情であり、そのため、国によっては深刻な環境汚染の原因となっており、その解決が求められている。

【0005】ところで、最近、食品の持つ「内分泌系、神経系、免疫系などに働きかけ、生体リズムの調整や、神経の覚醒と鎮静、生体防御系の調節などを行う生体調節の機能」が注目されている。この機能は、食品の栄養

素としての機能（食品の第一次機能）や、摂取するヒトの味覚や食感などの感覚を刺激する機能（食品の第二次機能）に続く、食品の第三の機能である。すなわち、従来の食品を成分化学や嗜好性、ひいては美味しさ、不味さ等から捉える視点ではなく、食品を摂取後の消化過程で新たに生じた分解成分が、新たな生理活性を発現したりする機構の解析から、食品が本来そのような潜在的な役割を有し、そのために合目的に分子設計されてきたのではないかという視点から、食品を捉え直す研究が盛んに行われつつある。そして、このような生体調節機能を有すると認められた食品成分や食品を、特定保健食品として認可する制度の整備が進んでいる。

【0006】この生体調節機能についての研究は、畜産食品においても進められている。中でも、乳タンパク質、鶏卵タンパク質及び食肉（特に鶏肉）などにおいては、生体調節機能の研究が進んでおり、種々の生理活性ペプチドが誘導されている。例えば、ウシやヒトの乳由来のカゼインからは、オピオイドペプチド、オピオイドアンタゴニストペプチド、平滑筋作動性ペプチド、ファゴサイトシス促進ペプチド、アンジオテンシン転換阻害ペプチド、細胞成長促進ペプチド、血漿凝集阻害ペプチドなどの生理活性ペプチドが誘導されている。

【0007】しかしながら、ホエーに含まれるタンパク質成分よりの生理活性ペプチドの誘導についての報告は見当たらない。これは、乳タンパク質の主成分はカゼインであり、ホエータンパク質成分については、あまり重要視されなかったためと考えられる。

【0008】本発明者らは、これまで余り注目されていなかったホエーについて研究を続けてきており、これまでの本発明者らの研究により、ホエーに含まれるカゼイノグリコペプチド（以下、CGPと略称する。）のプロテアーゼ消化物中にも、アンジオテンシン転換阻害ペプチドが含まれていることが分かった。

【0009】アンジオテンシン変換酵素（以下、ACEと略称する。）は、細胞膜結合性酵素であり、特に肺血管内皮細胞膜に豊富に存在する。ACEは、標的ペプチドのカルボキシル末端より2残基分のジペプチド部分を加水分解して遊離させる「ジペプチジルカルボキシペプチダーゼ」の一種である。肝臓で生合成され、血中に放出されたアンジオテンシノーゲンが、主として腎臓の傍糸球体細胞で生合成されたタンパク質分解酵素の一つであるレニン（EC3.4.23.15）で加水分解され、血中にアンジオテンシン1が生成し、これがACEに切断されてアンジオテンシン2が生じる。この成分は、平滑筋を収縮させるために、強い昇圧作用（血圧を上げる作用）を示す。また、このACEは、降圧作用（血圧を下げる作用）を示すブラジキニンの分解にも直接関与するため、二重の意味で血圧上昇作用を示すことになる。何故、ある種のペプチドがこのACEの転換阻害活性を示すのかは、明確に分かっていない。

【0010】アンジオテンシン転換阻害活性を有するペプチド（以下、ACE転換阻害ペプチドと略称する。）は、ACEによる加水分解を阻害するため、上記のアンジオテンシン1からアンジオテンシン2を生成させない。このようなペプチド類が消化吸収され、血中に入り、血流を循環することになれば、肺に局在するACEを阻害し、降圧作用の発現が期待される。

【0011】本発明者らは、ホエーをタンパク質分解酵素処理することにより、このACE転換阻害ペプチド類を誘導できることを見出した。さらに、乳酸発酵を導入することにより、風味の改善やラクトースの事前分解による腸管への負担の軽減などを図ることに成功した。

【0012】本発明は、これまで製造例や販売例のない、ホエーをベースにした保健栄養効果の高い新型ドリンク（新型ホエー飲料）を提供しようとするものである。乳成分濃度と乳酸菌数を制御することで、発酵乳、あるいは、乳酸菌飲料のいずれともすることもできる。すなわち、本発明は、高いACE転換阻害活性を有し、血圧降下作用が期待できるホエー飲料を提供することを目的とするものである。さらに本発明は、有用乳酸菌やその発酵代謝物を共に含有しているため、高い免疫賦活化能が期待でき、風味も良好なホエー飲料を提供することを目的とするものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】請求項1記載の本発明は、ホエー由来の新規生理活性ペプチド類、乳酸菌及びその代謝生産物を含有するホエー飲料を提供するものである。

【0014】請求項3記載の本発明は、ホエーにタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）を作用させ、新規生理活性ペプチド類を遊離させたホエー加水分解物を得た後、乳酸菌を接種し、乳酸発酵させることを特徴とする、前記請求項1記載のホエー飲料の製造法を提供するものである。

【0015】

【発明の実施の形態】上記のように、請求項1記載の本発明のホエー飲料は、請求項3記載の本発明の製造法により得られるものである。すなわち、請求項1記載の本発明のホエー飲料は、請求項3に記載のように、チーズを製造する産業の副産物であるホエーに対し、タンパク質分解酵素を作用させ、新規生理活性ペプチド類を遊離させたホエー加水分解物を得た後、乳酸菌を接種し、乳酸発酵を行わせることによって製造されるものである。

【0016】従って、以下、請求項3記載の本発明について説明し、次いで請求項1記載の本発明について説明することとする。

【0017】なお、請求項1記載の本発明のホエー飲料は、乳酸菌数と乳成分濃度を制御することで、法令の定める発酵乳又は乳酸菌飲料とすることができる。すなわち、飲料1ml当たりの乳酸菌の生菌数が $10^7$ 個（一千万

個）以上であって、かつ、無脂乳固形分が8.0%以上のものである場合は、発酵乳として表示することができる。また、無脂乳固形分が8.0%未満のものであっても、3.0%以上のものである場合は、乳酸菌飲料として表示することができる。

【0018】請求項2記載の本発明においては、まずホエーにタンパク質分解酵素を作用させ、消化させる。これにより、血圧上昇作用を持つアンジオテンシン変換酵素（ACE）の活性を阻害するペプチド成分を誘導させる。

【0019】本発明の原料となるホエーとタンパク質分解酵素について検討するために、本発明者らは次の実験を行った。

【0020】まず3種類の試料〔試料A：ホエータンパク質（CGPを含む試料）、試料B：ホエータンパク質（CGPを含まない試料）及び試料C：市販のホエーパウダー（以下、WPと略称する。）〕を用意した。このうち試料Cは、市販のWPをそのまま用いたが、その化学組成及び諸性質は次の第1表に示す通りである。

【0021】

【表1】

第1表（CWPの化学組成と諸性質）

成 分	含 量
全固形分	95.0%以下
脂肪	1.5%以下
タンパク質	10.9%以上
ラクトース	84.0%以下
灰分	6.6~7.2%
生菌数	50,000個/g以下
大腸菌群	陰性
pH（10%）	5.5~6.5

【0022】試料Aは、試料Cで用いたものと同様のWPを水に分散させた後、透析チューブに移し、蒸留水に対して十分に透析し、透析内液の全て（沈殿部を含む）を凍結乾燥したものである。ミルク由来の塩やラクトースは除かれているが、CGPを含んでいるホエータンパク質混合物である。

【0023】試料Bは、試料Cで用いたものと同様のWPを12%トリクロ酢酸溶液に分散させ、遠心分離により沈殿部（ホエータンパク質）を得た後、これを再度蒸留水に分散させて十分に透析した後に凍結乾燥させたものである。ミルク由来の塩、ラクトース及びカゼイン由来のCGPのいずれも除去されており、純粋なホエータンパク質混合物そのものである。これらのタンパク質試料は、WPの製造段階の噴霧乾燥過程で加熱された際に、その一部が熱変性をしており、水に不溶の画分も含まれている。

【0024】以上の試料A、B及びCのそれぞれに、起源の異なる7種類のタンパク質分解酵素〔1：ペプシン（消化液）、2：トリプシン（消化液）、3：キモトリプシン（消化液）、4：プロティナーゼK（カビ）、

5: アクチナーゼE (放線菌)、6: サーモライシン (細菌)、7: パパイン (植物)] を加え、それぞれの最適条件下 (最適緩衝液、最適pH、最適温度) で、24時間反応させ、次いで100℃で10分間加熱して酵素反応を停止させた。この溶液を、良く攪拌して不溶部を含んだままACE転換阻害活性用被験液とした。

【0025】具体的には、これらの反応液を、ボルテックスを用いて十分に攪拌し、その75 $\mu$ lを用いて、ACE転換阻害活性を測定した。ここで各試料の使用量は、試料A、Bでは各10mg、試料Cは第1表から、タンパク質含量を10%と概算したため、100mgとし、これを各10mlの緩衝液に分散させ、基質蛋白質の5%量 (基質: 酵素=5: 100重量比) に相当する0.5mgの各種酵素を用いた。なお、試料中のタンパク質含量は、フェノール試薬を用いたFolin-Lowry法により求めた。

【0026】ACE転換阻害活性の測定は、Liebermanの原法 (Am. Rev. Resp. dis., 109, 743 (1974)) の改良法である、山本らの方法 (日胸疾会誌、18、297 (1980)) に準じて行った。すなわち、ネジ付き試験管に被験液の試料を採り、次いで基質溶液 (馬尿酸-ヒスチジルロイシン、合成基質、ホウ酸緩衝液に溶かしたもの、pH8.3) を加え、次いでACE酵素溶液 (ウサギ肺由来、和光純薬工業製、50%グリセロールに溶かしたもの) を加えてから、37℃で1時間反応させた。同時に、コントロールとブランクについても同様の操作を行った。0.5N塩酸を加えて反応を停止させた後、反応停止液に酢酸エチルを加え、酵素活性に応じて生成した馬尿酸を液相抽出した。次いで、この抽出液 (酢酸エチル) を80℃に加熱しながら、チッソ噴霧法により除去した後、残渣を生理食塩水に溶解させて、228nmの紫外外部吸収を測定した。ACE転換阻害活性値は、以下の式により求めた。

【0027】

【数1】・ACE転換阻害活性 (%) =  $(E_c - E_s) / (E_c - E_b) \times 100$

【0028】但し、式中の  $E_c$  はコントロールの紫外外部吸収 (228nm)、 $E_s$  は被験液の紫外外部吸収 (228nm)、 $E_b$  はブランクの紫外外部吸収 (228nm) とする。

【0029】試料Aで得られたACE転換阻害活性値の測定結果を、図1に示した。用いた7種類のタンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) の全てで、比較的高いACE転換阻害活性が誘導された。特に、パパイン消化試料 (試料A-7) で最も高い活性値 (91.91%) が得られた。次いで、サーモライシン (試料A-6) 及びプロティナーゼK (試料A-4) による消化後にも、それぞれ86.52%および85.67%という高い活性が誘導されることが分かった。

【0030】また、試料Bで得られたACE転換阻害活

性値の測定結果を、図2に示した。用いた7種類のタンパク質分解酵素の全てで、試料Aと同様に高いACE転換阻害活性が誘導された。試料Aと比較すると、アクチナーゼEによる転換阻害活性だけが特に低い値を示したが、他のタンパク質分解酵素では全て70%以上の活性が誘導されることが分かった。最も高い活性 (95.22%) は、サーモライシン (試料B-6) で誘導され、ペプシン (試料B-1) でも93.12%と高かった。両試料の成分的な違いは、カゼイン由来のCGPが含まれているか否かの差のみであるが、この結果からは、ホエータンパク質から誘導されるACE転換阻害活性の方がCGPより誘導されるそれよりもはるかに高いことが予想され、CGPのホエー試料における有無はあまり問題でないことが分かった。

【0031】最後に、試料Cで得られたACE転換阻害活性値の測定結果を、図3に示した。試料Aおよび試料Cと同様に、WPそれ自体でも、ホエータンパク質をわざわざ単離して利用するまでもなく、全ての酵素で55%以上の活性が誘導されることが確認された。特に高い98.56%という活性は、サーモライシン (試料C-6) で誘導されたが、ほぼ同程度の活性がプロティナーゼK (C-4) でも検出された。

【0032】以上の実験結果から、本発明のホエー飲料の原料となるホエーは、チーズを製造する産業の副産物として得られるものであれば、いずれをも用いることができるが、ホエータンパク質を膜処理などの手法で単離したものなどでなくとも良く、安価かつ容易に入手できるWPで充分であることが分かった。

【0033】すなわち、ホエー (cheese whey) は、チーズ製造やカゼイン製造の副産物として得られるものである。このようなホエーとしては、ゴーダチーズやチェダーチーズなどの製造によって生じる甘性ホエー (sweet cheese whey) (中性ホエー) と、カッテージチーズやカゼインなどの製造によって生じる酸性ホエーとがあるが、本発明においては、このいずれをも使用することができる。

【0034】さらに、このようなホエーだけでなく、ホエーを粉末化したホエーパウダー (WP)、ホエータンパク質の濃縮物 (WPC)、ホエータンパク質の分画物 (WPI) などを用いることもでき、これらを水で還元してホエータンパク質を含む溶液にして用いても良い。但し、ホエータンパク質を膜処理などの手法で単離・利用することは経済的にも時間的にも大変な時間がかかるが、本発明においては、上記したように、安価かつ容易に入手できるWPで充分である。

【0035】また、本発明のホエー飲料に用いるタンパク質分解酵素としては、特に血圧降下作用のあるペプチド類を最も良く生成する点から、細菌由来のサーモライシン、消化液由来のペプシン、トリプシンおよびキモトリプシン、カビ由来のプロティナーゼ (プロティナーゼ

K)、放線菌由来のアクチナーゼE、植物由来のパパインなどが挙げられ、これらのいずれを用いても構わない。上記した実験結果からは、比較的安価で高純度の酵素製品が安定入手できる点から、プロティナーゼKなどが好適であることが分かる。

【0036】上記の如きホエーにタンパク質分解酵素を作用させる条件、すなわち酵素反応の際の温度、時間、pH等は、用いる酵素に好適な範囲とすれば良い。例えば、タンパク質分解酵素としてプロティナーゼKを用いた場合、2～4時間の範囲で充分なACE転換阻害活性が得られる。

【0037】より具体的には、例えば、市販のWPを用い、無脂乳固形分が3%以上のWP水溶液を作成する。このWP水溶液には、糖源としてラクトースが存在するので、新たに他の糖質を補う必要はない。しかし、本発明においては、糖源として、例えばグルコース及び/又はスクロースを添加しても構わない。

【0038】得られた溶液について、ホエーに含まれるタンパク質よりACE転換阻害ペプチド類を得るために、タンパク質分解酵素による反応を行う。反応条件は、用いる酵素に応じて異なり、一義的に規定することはできないが、高いACE転換阻害活性を得ることができる範囲の温度、時間、pHであることが望ましい。例えば、プロティナーゼKを用いるときは、37℃前後の温度の場合、1～24時間、好ましくは2～4時間程度行えば良い。ここで酵素処理時間が、その酵素にとっての最適時間に比べて短か過ぎると、WPに含まれるACE転換阻害ペプチド類の誘導が不充分となり、好ましくない。一方、酵素処理時間が長いと、乳酸菌の生育は高まるものの、苦みペプチドの生成の可能性が増したり、製品の風味が落ちたり、さらには、せっかく生成した生理活性ペプチド類が乳酸菌により資化され減少する可能性があるため、好ましくない。

【0039】請求項3記載の本発明においては、上記のようにホエーにタンパク質分解酵素を作用させ、新規生理活性ペプチド類を遊離させたホエー加水分解物を得た後、乳酸菌を接種し、乳酸発酵させる。但し、必要に応じて、ホエーにタンパク質分解酵素を作用させながら、乳酸発酵させることもできる。

【0040】ここで接種する乳酸菌は、一般に発酵乳に使用されているものであれば、いずれも用いることが出来る。それらの一例としては、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属乳酸菌、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属乳酸菌、ロイコノストック (*Leuconostoc*) 属乳酸菌、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属乳酸菌がある。本発明において、これらの乳酸菌は、1種を単独で用いても良いし、或いは2種類以上を組み合わせることもできる。

【0041】本発明では、これらの中でも特にヨーグルト製造に一般的に使用されているラクトバチルス・デル

ブレッキ・サブスピーシーズ・ブルガリクス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) (ブルガリア菌) と、ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラス (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) (サーモフィラス菌) とを用いた。

【0042】より具体的には、ラクトバチルス・デルブレッキ・サブスピーシーズ・ブルガリクス B6 株 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NIAI B6) (以下、単に B6 株と略称する。)、同 B5b 株 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NIAI B5b) (以下、単に B5b 株と略称する。)、ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラス 510 株 (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* NIAI 510) (以下、単に 510 株と略称する。)を用いた。これら菌株は、いずれも農林水産省畜産試験場に保管されており、分譲申請により入手することが可能である。

【0043】本発明では、このような乳酸菌の代わりに、ビフィズス菌や、ケフィールグレインのような混合した天然の発酵種をスターターとして用いることもできる。ビフィズス菌としては、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・ロンガム (*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) 等が挙げられる。

【0044】さらに、本発明者らは、ホエー飲料に適した乳酸菌の発酵条件を検討するために、以下の実験を行った。

【0045】すなわち、WP 7g に蒸留水 93g を加え、7% (w/w) WP 溶液を作成し、これを基本培地とした。また、この基本培地にグルコース (ブドウ糖) 2% を添加した培地 (培地 D) と、基本培地にスクロース (ショ糖) 10% を添加した培地 (培地 E) を作成した。これらの培地に、以下のようにして、乳酸菌 (2つの組み合わせの乳酸菌スターター) を接種して、6種の試料を作成した。

【0046】

・試料 D-1: 基本培地 + B6 株 + 510 株

・試料 D-2: 基本培地 + B5b 株 + 510 株

・試料 D-3: 基本培地 + B6 株 + 510 株 + 2% グルコース

・試料 D-4: 基本培地 + B5b 株 + 510 株 + 2% グルコース

・試料 E-1: 基本培地 + B6 株 + 510 株 + 2% スクロース

・試料 E-2: 基本培地 + B5b 株 + 510 株 + 2% スクロース

【0047】これらの試料は、培地を 100℃ で 10 分間加熱殺菌してから、2つの組み合わせの乳酸菌スター

ターを添加し、37℃で24時間培養した後、pH値及び乳酸酸度の経時変化を検討した。なお、WP試料に窒素源を新たに加えるのではなく、プロテアーゼ消化をさせ、既にWP中にあるタンパク質より窒素源を生じさせた。

【0048】ここで乳酸酸度は、乳酸菌を接種し、培養した試料中の酸性物質を、乳酸に換算して重量%で示した。すなわち、試料10gを三角フラスコに取り、蒸留水10mlとフェノールフタレイン指示薬0.5mlを加えた。次いで、ビュレットより、0.1N NaOH 溶液を、微紅色が消えない点まで滴下した。乳酸酸度は以下の式より求めた。

【0049】

【数2】・乳酸酸度(重量%) =  $\text{NaOH滴下量(ml)} \times \text{ファクター} \times 0.009 / \text{試料重量(g)} \times 100$

【0050】試料D-1～D-4における乳酸菌の生育性をpH値及び乳酸酸度の経時変化により検討した結果を、図4に示した。すなわち、図4は、2%グルコースを添加した7%WP培地における乳酸菌接種後のpH値及び乳酸酸度の経時変化を示すグラフであり、図4

(a)がpHの経時変化を示すグラフであり、図4

(b)が乳酸酸度の経時変化を示すグラフである。

【0051】図4に示した通り、試料D-1、D-2、及びグルコースを添加した試料D-3、D-4には、最終pH値及び乳酸酸度に差が認められなかった。すなわち、24時間培養後では、コントロールとしての試料D-1及び試料D-2では、pH値は、それぞれ4.32及び4.53に減少し、乳酸酸度は、それぞれ0.40及び0.32であった。一方、2%グルコースを添加した培地についてみると、試料D-3及び試料D-4では、pH値は、それぞれ4.53及び4.55に減少し、乳酸酸度は、それぞれ0.31および0.30であった。

【0052】さらに、2種類の乳酸菌の組み合わせにも、有意差は認められず、どちらの組み合わせでも十分な生育が得られることが分かった。

【0053】また、試料E-1及び試料E-2における24時間培養までのpH値及び乳酸酸度の経時変化も、図4に示したグルコースの場合とほとんど同様の結果を示した。

【0054】以上の結果より、乳酸菌培養においては、7%WP試料中の糖源として存在するラクトース(第1表より計算して、約5.88%のラクトース濃度)で充分であり、新たに炭素源としての他の糖質を補う必要はないことが分かった。

【0055】また、7%WP試料に、タンパク質分解酵素アクチナーゼEを添加(15mg/100gのWP溶液)し、37℃で、2時間、4時間及び24時間反応させた。次いで、培地を加熱殺菌(100℃、10分)し、2種の組み合わせの乳酸菌スターター(B6株+5

10株と、B5b株+510株の2種)を加えて、37℃で24時間培養し、経時的にpH値と乳酸酸度を測定し、その結果を図5に示した。すなわち、図5は、タンパク質分解酵素アクチナーゼEによる2時間及び4時間反応試料における乳酸菌接種後のpH値と乳酸酸度の経時変化を示すグラフであり、図5(a)がpHの経時変化を示すグラフであり、図5(b)が乳酸酸度の経時変化を示すグラフである。

【0056】図5に示す通り、2時間及び4時間のタンパク質分解酵素処理時間では、その後の乳酸菌の生育性に全く差が認められなかった。さらに、2種類の乳酸菌の組み合わせにも、有意差は認められなかった。

【0057】一方、アクチナーゼEで37℃、24時間充分に消化した後は、最終的なpHと酸度には大きな差異が認められた。図6は、アクチナーゼEによる24時間反応試料における乳酸菌接種後のpH及び乳酸酸度の変化を示すグラフであり、図6(a)がpHの経時変化を示すグラフであり、図6(b)が乳酸酸度の経時変化を示すグラフである。

【0058】図6に示すように、タンパク質分解酵素処理を行なわなかったコントロール試料では、24時間後のpHが6.46から4.62-4.66と大きく減少し、酸度も0.09から0.30-0.31に大きく上昇した。一方、アクチナーゼEを添加し、24時間消化した試料では、pHが5.70から3.82-3.90とコントロールより大きく減少し、酸度も0.23から0.94-1.04とコントロールより大きく上昇した。

【0059】従って、24時間という長時間のタンパク質分解酵素消化を継続すれば、コントロールに比較して多くのペプチドや遊離アミノ酸が生成したために、より乳酸菌の生育性が向上したものと解釈された。

【0060】また、7%WP試料に対して、アクチナーゼEと乳酸菌を同時に加え、タンパク質分解酵素消化反応を行いながら、乳酸菌培養を行うことも、モデル的に試みた。その結果、コントロールとほとんど差異を生じず、乳酸菌は良好に生育し、図5と同様の結果が得られた。

【0061】ここで本発明のホエー飲料の製造法の一例を述べると、以下の通りである。市販のWPを用い、7%(w/w)WP水溶液を作成する。このWP水溶液には、糖源としてラクトースが存在するので、新たに他の糖質を補う必要はない。しかし、糖源としてグルコース及び/又はスクロースを添加しても構わない。得られた溶液について、ホエーに含まれるCGPのACE転換阻害ペプチドを得るために、タンパク質分解酵素反応を行う。酵素反応の際の温度、時間及びpHは、用いる酵素に最適の範囲とすれば良い。例えば、プロティナーゼKを用いる場合、37℃で2時間程度行えば良い。上記の酵素反応を行った後、得られた試料を75℃で15分間

加熱殺菌し、次いで乳酸菌を添加し、乳酸発酵を行う。乳酸発酵の時間は、用いる乳酸菌の種類によって大きく異なり、ヨーグルトスターターを用いた場合、乳業現場での実際のヨーグルト発酵時間である4時間程度でも良いが、好ましくは8時間以上行うことにより、添加スクロースの甘味とバランスのとれた酸味を有するホエー乳酸菌飲料を提供することができる。図7は、このような本発明のホエー飲料の製造法の一例を示すフローチャートである。通常は、最も一般的に使用されるプロティナーゼKを用いた場合、37℃程度の温度にて、酵素処理は2時間以上とし、乳酸発酵は4時間以上、できれば8時間以上とすることが好適である。

【0062】以上の如くして、目的とする、請求項1記載のホエー由来の新規生理活性ペプチド類、乳酸菌及びその代謝生産物を含有するホエー飲料が得られる。このようにして得られるホエー飲料は、発酵乳の場合、通常、乳酸菌の菌数としては、 $2.5 \times 10^7$  cells/ml程度含有し、その重量としては、約1g/L程度含有するものである。また、乳酸量としては、約15~20mg/ml程度含有するものである。

【0063】なお、本発明のホエー飲料には、必要に応じて、ラクトース、スクロース等の糖類、トリポリリン酸塩、メタリン酸ナトリウム等のリン酸塩類、安定剤を添加することができる。その他、本発明のホエー飲料には、各種香料、果汁、果肉、調味料等を添加することもできる。

#### 【0064】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明するが、本発明はこれにより限定されるものではない。

#### 【0065】参考例1

第1表に示す化学組成と諸性質を有するWP7g及びスクロース10gを蒸留水83gに加え、7% (w/w) WP溶液を作成し、出発試料E-0とした。この試料E-0について、ACE転換阻害活性値、pH値、酸味のバランス度を調べた。結果を第2表に示す。なお、酸味のバランス度は、複数のパネラーにより、甘味と酸味及び風味の総合点で判定した。判定は3段階〔◎=良い、○=普通、△=やや劣る〕にて評価した。

#### 【0066】参考例2

参考例1で作成した試料E-0に、酵素：基質が2:100 (w/w) であるプロティナーゼK (*Tritirachium album* 由来、EC 3.4.21.14、30m Anson単位/mg、ドイツ Merck 社製) を添加し、37℃で2時間処理して得られた試料E-1を、続いて、75℃で15分間加熱殺菌し、試料E-10を得た。この試料E-10について、ACE転換阻害活性値、pH値、酸味のバランス度を調べた。結果を第2表に示す。

#### 【0067】参考例3

参考例1で作成した試料E-0に、酵素：基質が2:100 (w/w) であるプロティナーゼK (同前) を添加

し、37℃で4時間処理して得られた試料E-2を、続いて、75℃で15分間加熱殺菌し、試料E-20を得た。この試料E-20について、ACE転換阻害活性値、pH値、酸味のバランス度を調べた。結果を第2表に示す。

#### 【0068】実施例1

参考例1で作成した試料E-0に、酵素：基質が2:100 (w/w) であるプロティナーゼK (同前) を添加し、37℃で2時間処理して得られた試料E-1を、続いて、75℃で15分間加熱殺菌した後、2%乳酸菌カルチャー (前記B6株と前記510株をそれぞれ1%ずつ) を接種し、4時間培養し、試料E-104を得た。なお、使用した乳酸菌は、スキムミルク中で-20℃に凍結保存しておいたストックカルチャーを、スキムミルクを用いて3回継代培養したものをを用いた。この試料E-104について、ACE転換阻害活性値、pH値、酸味のバランス度を調べた。結果を第2表に示す。

#### 【0069】実施例2

実施例1において、4時間培養する代わりに、8時間培養を行ったこと以外は、実施例1と同様にして行い、試料E-108を得た。この試料E-108について、ACE転換阻害活性値、pH値、酸味のバランス度を調べた。結果を第2表に示す。

#### 【0070】実施例3

実施例1において、4時間培養する代わりに、24時間培養を行ったこと以外は、実施例1と同様にして行い、試料E-1024を得た。この試料E-1024について、ACE転換阻害活性値、pH値、酸味のバランス度を調べた。結果を第2表に示す。

#### 【0071】実施例4

比較例1で作成した試料E-0に、酵素：基質が2:100 (w/w) であるプロティナーゼK (同前) を添加し、37℃で4時間処理して得られた試料E-2を、続いて、75℃で15分間加熱殺菌した後、2%乳酸菌カルチャー (前記B6株と前記510株をそれぞれ1%ずつ) を接種し、4時間培養し、試料E-204を得た。この試料E-204について、ACE転換阻害活性値、pH値、酸味のバランス度を調べた。結果を第2表に示す。

#### 【0072】実施例5

実施例4において、4時間培養する代わりに、8時間培養を行ったこと以外は、実施例4と同様にして行い、試料E-208を得た。この試料E-208について、ACE転換阻害活性値、pH値、酸味のバランス度を調べた。結果を第2表に示す。

#### 【0073】実施例6

実施例4において、4時間培養する代わりに、24時間培養を行ったこと以外は、実施例4と同様にして行い、試料E-2024を得た。この試料E-2024について、ACE転換阻害活性値、pH値、酸味のバランス度

を調べた。結果を第2表に示す。

【表2】

【0074】

第2表

	タンパク質分解 酵素の反応時間 (時間)	乳酸発酵の 時間 (時間)	ACE転換 阻害活性	pH	酸味のバラ ンス度
参考例1	0	0	0	6.35	—
参考例2	2	0	98.87	6.21	—
参考例3	4	0	99.75	6.21	—
実施例1	2	4	95.50	5.76	△
実施例2	2	8	96.87	5.38	◎
実施例3	2	24	97.62	4.22	○
実施例4	4	4	98.37	5.75	△
実施例5	4	8	95.63	4.98	○
実施例6	4	24	97.87	4.51	○

【0075】第2表の結果からは、参考例2に示すように、タンパク質分解酵素反応が2時間という短時間でも、ほぼ100%に近い値が得られることが分かった。このようにタンパク質分解酵素反応は2時間という短時間で良いことが分かったので、この条件下で、さらに乳酸発酵について検討した。すると、乳酸菌の発酵時間は、実施例1に示すように、4時間でも良いが、実施例2に示すように、試料E-108、つまり乳酸発酵を8時間行った後に生成したホエー乳酸菌飲料が、添加スクロースの甘みとバランスのとれた酸味を呈することが分かった。従って、最も好結果となった、この実施例2の試料について、以下に示す実施例7と実施例8の2つの実験を行った。

【0076】実施例7 (IC<sub>50</sub>値の測定)

実施例2から、好結果が出された試料E-108について、以下の操作により、50%ACE転換阻害活性値(以下、IC<sub>50</sub>値と称する。)を与える試料濃度を検討した。まず、E-108の試料溶液そのものを用いて、ACE転換阻害活性を検討した。その結果を図8に示した。図8は、E-108の試料溶液のACE転換阻害活性を示すグラフであり、本発明の新型ホエー飲料の示す容量依存的なACE転換阻害活性を示すものである。その結果、本試料は、原液の約1.32μl/150μl量の被験液、すなわち8.8μl/ml量を用いれば、この実験系において、50%のACE転換阻害活性を発現することが明らかとなった。

【0077】次いで、この試料E-108の正確なタンパク質濃度をFolin-Lowry法により定量した。その結果、蒸留水で400倍に希釈した、この試料溶液1μlには、40.3ngの含窒素成分を含んでいることがわかった。この含窒素成分は、ペプチド、タンパク質、遊離アミノ酸などからなる混合物と推定される。従って、

原液の試料E-108は、約1.61g/100mlのタンパク質を含むことが明らかとなった。

【0078】このタンパク質含量値により、図8を計算し直した結果を図9に示した。図9は、E-108の試料溶液のIC<sub>50</sub>値を示すグラフである。図9から、本試料のIC<sub>50</sub>値は、59.09ngと極めて低く、文献値と比較してもかなり高いACE転換阻害活性ペプチド類がホエータンパク質より誘導されることが初めて明らかとなった。

【0079】なお、IC<sub>50</sub>値は次のようにして測定した。すなわち、試料E-108の一定量を用い、前記した山本らの方法に準じてACE転換阻害活性を測定し、次いで、この試料中のタンパク質含量を測定し、容量データをタンパク質含量データに変換して、最終的にACE転換阻害活性曲線を求め、さらに計算によりIC<sub>50</sub>値を求めた。

【0080】実施例8 (乳酸菌生菌数の測定)

わが国では、飲料1ml当たりの乳酸菌の生菌数が10<sup>7</sup>個(一千万個)以上のもののみを、無脂乳固形分の割合に応じて発酵乳(無脂乳固形分が8.0%以上)又は乳酸菌飲料(無脂乳固形分が3.0%以上)と表示することができる。そこで、公定法に従って、実施例2の試料(試料E-108)中の乳酸菌生菌数を測定した。

【0081】実施例2の試料中の乳酸菌生菌数の測定は、厚生省の法令で指定されている乳酸菌数測定用・公定法培地(BCP加プレートカウントアガール、日水製薬製、コードNo.05622)を用いて測定した。すなわち、カウントアガール24.7gを蒸留水1リットルに加熱溶解し、滅菌試験管に20mlずつ分注後、121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。試料を予めオートクレーブ滅菌しておいた生理食塩水を用いて、10<sup>0</sup>個、10<sup>1</sup>個、10<sup>2</sup>個、10<sup>3</sup>個、10<sup>4</sup>個、10<sup>5</sup>個、10<sup>6</sup>個、10<sup>7</sup>個及び1



0<sup>8</sup>個に段階希釈した。この各段階希釈液0.1mlを、予め溶解し50℃に保持しておいた培地20mlと、滅菌シャーレ内で合わせ、固化後、37℃のインキュベーター内で無菌的に72±3時間培養した。規定時間後のシャーレにおいて、公定法に従い、30～300個の黄変コロニーを与えるプレートを選び、正確にカウントした。カウントの平均値(平均コロニー数)に希釈倍率を乗じることにより、試料1ml中の乳酸菌生菌数を推定した。

第3表

希釈率	カウント数(個)	平均コロニー数(個)	生菌数(個/ml)
10 <sup>6</sup>	32 15	24	—
10 <sup>5</sup>	315 187	251	2.5×10 <sup>8</sup>
10 <sup>4</sup>	1000以上 1000以上	—	—

## 【0084】

【発明の効果】本発明のホエー飲料は、高いACE転換阻害活性を有する。これは、WP中のホエータンパク質が酵素的な分解を受け、新たに生じたペプチド類が、このような新規な生理活性を発現したものと考えられる。従って、本発明のホエー飲料は、摂取後は大いに血圧降下(降圧)作用を期待することができ、保健健康飲料として新たな市場拡大を図ることが期待される。

【0085】また、本発明のホエー飲料は、酵素処理を施した消化液に、ヨーグルト製造用の乳酸菌を接種し、乳酸発酵させたものであり、乳酸菌やその代謝生産物(発酵代謝物)を含有しているので、風味と味も良好であるばかりか、高い免疫賦活化能が期待でき、菌体及び菌体外成分による保健栄養作用、整腸保健作用も加味されている。

【0086】なお、請求項1記載の本発明のホエー飲料は、乳成分濃度と乳酸菌数を制御することで、飲料1ml当たりの乳酸菌の生菌数が10<sup>7</sup>個(一千万個)以上とすることができ、この場合に、無脂乳固形分が8%以上であれば、発酵乳として表示することができる。また、無脂乳固形分が3%以上であれば、乳酸菌飲料として表示することができる。

【0087】しかも、本発明のホエー飲料は、その有効かつ高度利用が求められているホエーを原料にしており、また製造コストも安価なため、より付加価値が高くなっており、さらに環境汚染(水質汚染)の防止にも寄与するものである。

【0088】本発明は、これまで厄介者とししか位置づけられなかった、チーズを製造する産業における副産物(ホエー)の消費拡大と、高度利用に道を開くものと期待される。なお、本発明は、畜産振興事業団の平成7年度需要開発調査研究事業によりなされたものである。

【図面の簡単な説明】

結果を第3表に示す。

【0082】その結果、実施例2の試料(試料E-108)における乳酸菌生菌数は、2.5×10<sup>8</sup>個/mlであることが明らかとなった。この値は、この試料中に発酵乳又は乳酸菌飲料の表示規定に充分許可されうる量の生きている乳酸菌菌体が存在することを示していた。

【0083】

【表3】

【図1】試料Aで得られたACE転換阻害活性値の測定結果である。

【図2】試料Bで得られたACE転換阻害活性値の測定結果である。

【図3】試料Cで得られたACE転換阻害活性値の測定結果である。

【図4】試料D-1～D-4における乳酸菌の生育性をpH値及び乳酸酸度の経時変化により検討した結果を示すグラフであり、図4(a)がpHの経時変化を示すグラフであり、図4(b)が乳酸酸度の経時変化を示すグラフである。

【図5】アクチナーゼEによる2時間及び4時間反応試料における乳酸菌接種後のpH及び乳酸酸度の変化を示すグラフであり、図5(a)がpHの経時変化を示すグラフであり、図5(b)が乳酸酸度の経時変化を示すグラフである。

【図6】アクチナーゼEによる24時間反応試料における乳酸菌接種後のpH及び乳酸酸度の変化を示すグラフであり、図6(a)がpHの経時変化を示すグラフであり、図6(b)が乳酸酸度の経時変化を示すグラフである。

【図7】本発明のホエー飲料の製造法の一例を示すフローチャートである。

【図8】E-108の試料溶液のACE転換阻害活性を示すグラフである。

【図9】E-108の試料溶液のIC<sub>50</sub>値を示すグラフである。

【符合の説明】

A-1, B-1, C-1: ペプシン消化物

A-2, B-2, C-2: トリアシン消化物

A-3, B-3, C-3: キモトリプシン消化物

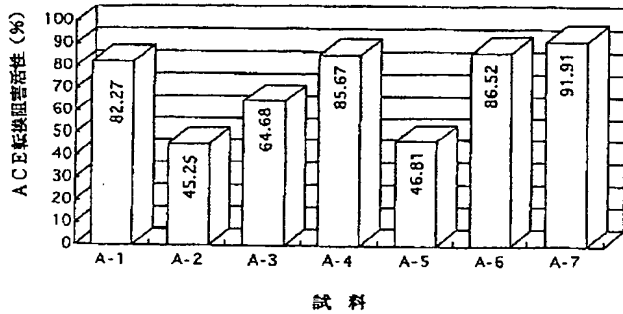
A-4, B-4, C-4: プロティナーゼK消化物

A-5, B-5, C-5: アクチナーゼE消化物

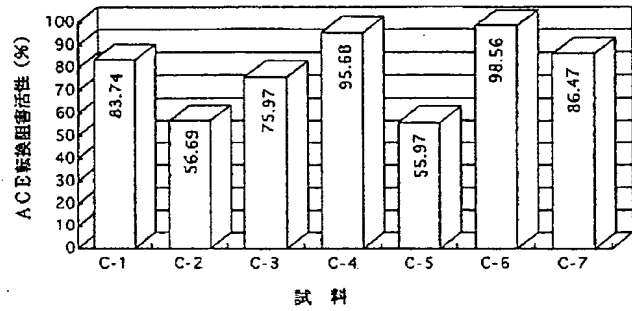
A-6, B-6, C-6: サーマライシン消化物

A-7, B-7, C-7: パパイン消化物

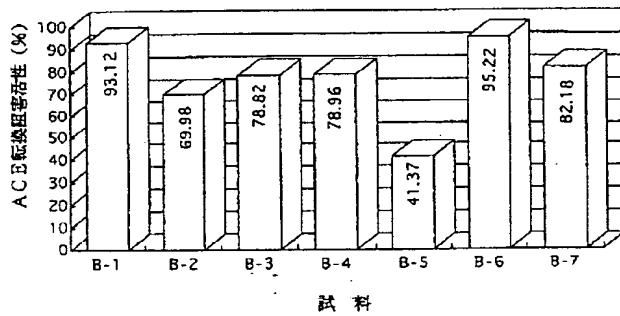
【図1】



【図3】



【図2】



【図7】

7% CWP試料 (7gのCWPおよび10gのスクロースを  
蒸留水83gに溶解させた溶液: 試料E-0)

— 2%プロテイナーゼK追加 (酵素: 基質 = 2:100 (v/v))

酵素消化 (37℃で2時間: 試料E-1、4時間: 試料E-2)

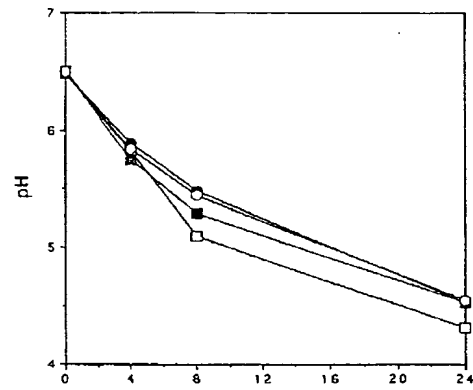
加熱処理 (75℃、15分)

— 2%乳酸菌カルチャー添加 (1% *L. bulgaricus*,  
1% *St. thermophilus*)

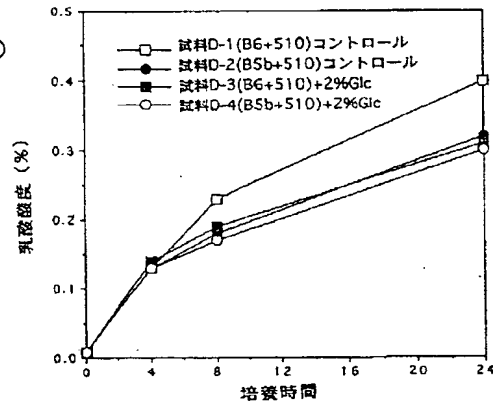
静置培養 (37℃、4時間、8時間、24時間)

検定 1 ACE阻害活性値の測定  
2 pH値測定  
3 ドリンクテストによる酸味と甘味のバランス

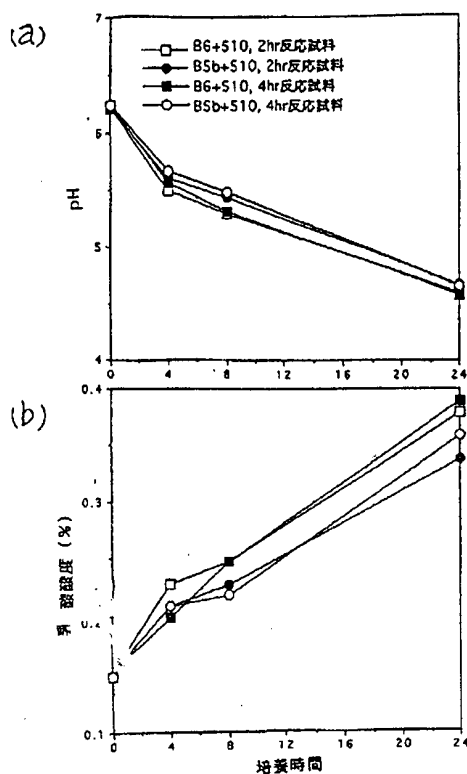
(a)



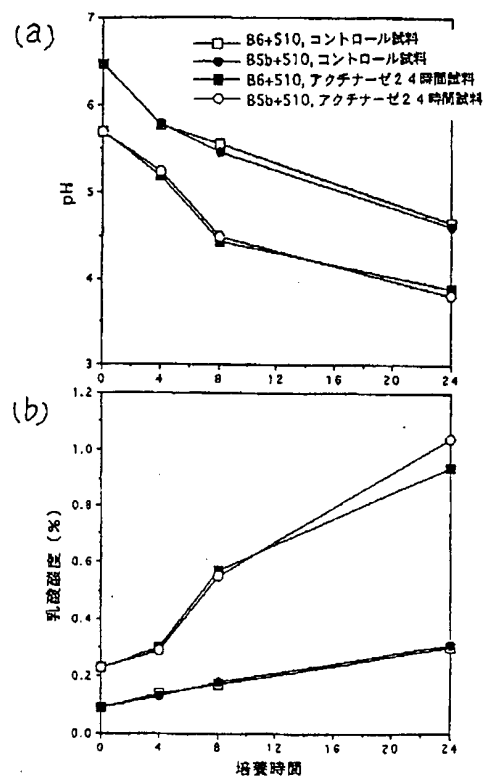
(b)



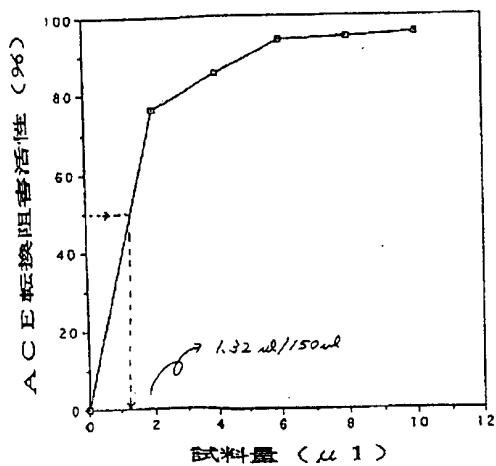
【図5】



【図6】



【図8】



【図9】

